

Pola Protein Sekret Kelenjar Parotoid Tiga Spesies Kodok dan Sekret Kelenjar Kulit Katak Kongkang Racun (*Odorrana hosii* Boulenger, 1891) Melalui SDS-PAGE

Protein Pattern of Parotoid Glands Secretion in Three Species Toads and Skin Gland Secretion of Poisonous Rock-Frog (*Odorrana hosii* Boulenger, 1891) Through SDS-PAGE

Mega Ayu Oktavina, Rarastoeti Pratiwi

Laboratorium Biokimia, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada
Jalan Teknik Selatan Sekip Utara, Yogyakarta, Indonesia
mega.ayu.o@mail.ugm.ac.id; rarastp@ugm.ac.id

Abstract: Toads (*Phrynoidis aspera*, *Ingerophrynus biporcatus*, *Duttaphrynus melanostictus*) and poisonous rock-frog (*Odorrana hosii*) are members of the class Amphibian from different Families. Previously, those three species toads were in the same genus called *Bufo*, but now they are clustered in a different genus based on the molecular systematic. Proteins secrete from the parotoid and skin glands are one of self-defense mechanisms against to predators. The aims of this study were to determine and compare the protein patterns in secretes from toad parotoid gland and skin gland of poisonous rock-frog. The specimens were obtained from sampling at several different locations according to their habitats. Secrete collections were done by stressing both physically and chemically. Secrete was extracted by the addition of acid and sonication. The secrete protein concentration was measured by the Bradford test, whereas protein patterns were analyzed by SDS-PAGE. The protein concentrations of secrete from toad's parotoid gland are higher (*Phrynoidis aspera* 3.50 µg/ml; *Duttaphrynus melanostictus* 6.7 µg/ml *Ingerophrynus biporcatus* 1.32 µg/ml) than in skin gland secretion of poisonous rock- frog (1.07 µg/ml). There are 6 protein bands in parotoid gland secretion of *Phrynoidis aspera*, 5 protein bands in parotoid gland secretion *Ingerophrynus biporcatus* and 7 protein bands in secrete of *Duttaphrynus melanostictus* parotoid glands with molecular weight ranges 12.09-172.51 kDa. However, those proteins are different size of molecular weights for each species. Furthermore, two protein bands (with different densities) are founded in skin gland secretion of poisonous rock-frog with molecular weight of 66.17 kDa and 78.73 kDa. The differences of genes, habitats and predators may influence the differences of protein patterns in secrete from toad's paratoid gland and frog's skin glands. Those protein patterns could be useful for further studies, especially on *Bufo* systematic, also for exploring the potential of protein secrete as antibacterial or antifungal.

Keywords: toad, frog, parotoid, skin, secrete, protein

1. PENDAHULUAN

Indonesia memiliki banyak keanekaragaman hewan seperti anggota Ordo Anura (kodok dan katak) yang dapat dimanfaatkan bagi kesejahteraan manusia. Beberapa spesies anggota Anura yang dapat ditemukan di Indonesia yaitu *Phrynoidis aspera*, *Ingerophrynus biporcatus*, *Duttaphrynus melanostictus* (kodok) dan *Odorrana hosii* (katak). Ketiga spesies kodok tersebut berada dalam Familia yang sama yaitu Bufonidae, sedangkan *Odorrana hosii* berada dalam Familia Ranidae.

Anggota Familia Bufonidae memiliki kelenjar parotoid yang terletak di *post-orbital* yang mampu menghasilkan sekret kental berwarna putih kekuningan (*milky*) yang beracun (Noble, 1931 dalam Malik, 2012). Sekret tersebut berperan sebagai mekanisme pertahanan diri utama bagi kodok dari predator dan infeksi mikrobial (Sciani *et al.*, 2013). Sekret tersebut mengandung berbagai macam senyawa kimia seperti protein, peptida, steroid dan alkaloid (Sciani, *et al.*, 2013). Sekret tersebut dapat menimbulkan beberapa efek yang menyebabkan munculnya rasa tidak nyaman.

Katak Kongkang Racun (*Odorrana hosii*) tidak mempunyai kelenjar parotoid, namun dapat

memproduksi sekret kelenjar kulit yang dapat memberikan efek yang serupa dengan sekret kelenjar parotoid kodok. Sekret kelenjar kulit katak Kongkang Racun berupa mukus kental yang tidak berwarna. Senyawa yang terkandung pada sekret tersebut menurut Ananias *et al.* (2008) dalam Qurniawan dan Pramana (2013), berupa asam sulfat dan glikoprotein. Protein sekret tersebut merupakan protein bioaktif yang berpotensi sebagai antimikrobia (Conlon *et al.*, 2008).

Kodok *Phrynoidis aspera*, *Ingerophrynus biporcatus*, dan *Duttaphrynus melanostictus* memiliki morfologi yang mirip. Berdasarkan sistem klasifikasi terdahulu, ketiga kodok tersebut pernah dikelompokkan dalam genus yang sama yaitu genus *Bufo*. Namun, seiring dengan penelitian sistematika molekuler (tingkat DNA), kini ketiganya tidak lagi disatukan dalam genus *Bufo*. Berdasarkan penelitian Frost *et al.* (2006), ketiga spesies tersebut memiliki susunan nukleotida yang berbeda pada fragmen DNA di lokus tertentu. Akibat adanya perbedaan pada fragmen DNA ini mengakibatkan ketiga spesies tersebut telah dibedakan dalam tiga genus yang berbeda yaitu *Phrynoidis*, *Ingerophrynus*, dan *Duttaphrynus*.

Adanya perbedaan DNA dari ketiga spesies tersebut, memungkinkan adanya perbedaan atau variasi protein yang terkandung dalam sekret kelenjar parotoid kodok. Dengan demikian, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui jenis dan banyaknya protein yang terkandung pada sekret kelenjar parotoid kodok dari pola protein yang dipisahkan melalui SDS-PAGE. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memperkuat klasifikasi spesies kodok tersebut berdasarkan pendekatan molekuler. Disamping itu, protein sekret kelenjar kulit kodok maupun kelenjar kulit katak Kongkang Racun, yang merupakan komponen dari mekanisme pertahanan diri kodok dan katak dari infeksi mikrobia patogen, dapat diteliti lebih lanjut perannya sebagai antimikrobia.

2. METODE

2.1. Preparasi Sampel dan Ekstraksi Protein

Kodok dan katak yang digunakan dalam penelitian ini merupakan individu betina dewasa yang diperoleh dari beberapa lokasi di Yogyakarta dan di Magelang, Jawa Tengah. Spesimen yang diperoleh dari *sampling* dibersihkan dengan akuades kemudian dilakukan *stressing* menggunakan eter bagi kodok dan penggojogan selama 5-10 menit dalam kantong plastik (berisi buffer Tris-HCl pH 7 mengandung 0,9% NaCl dan 0,1% SDS) bagi katak. Protoid

kodok dipijat dengan halus agar sekret keluar, kemudian ditampung dalam mikrotube sebanyak $\pm 100\mu\text{l}$ dan dilarutkan dalam buffer Tris-HCl pH 7 mengandung 0,9% NaCl dan 0,1% SDS. Larutan sampel diekstraksi dengan asam asetat glasial 0,1%, kemudian disonikasi selama 5 menit, diendapkan dengan ammonium sulfat jenuh 30% selama 24 jam dan disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit. Pelet dipisahkan dari supernatan dan dilarutkan dalam larutan PBS 1x.

2.2. Pengukuran Konsentrasi Protein

Pengukuran konsentrasi protein dilakukan dengan metode *Bradford*. Larutan standar yang digunakan adalah BSA (*Bovine Serum Albumin*). Sebanyak 20 μl larutan sampel diencerkan dengan akuades hingga volume total larutan 40 μl , kemudian ditambahkan reagen *Bradford* hingga 1ml dan dihomogenasi dengan menggunakan vorteks. Sebanyak 1 ml larutan sampel yang telah homogen dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis ($\lambda = 595 \text{ nm}$).

2.2. Analisis Pola Protein melalui SDS-PAGE

Analisis pola protein dilakukan dengan pemisahan pita protein melalui SDS-PAGE. Sebanyak 20 μl larutan sampel dilarutkan dalam 20 μl buffer sampel 10x kemudian dihomogenasi dengan vorteks dan didenaturasi dalam air mendidih selama 5 menit. Pemisahan protein sampel menggunakan gel akrilamid dengan konsentrasi *stacking gel* 5% dan *running gel* 10% dengan volume sampel tiap sumuran (*well*) sebanyak 15 μl . Aliran listrik yang digunakan untuk merambatkan sampel sebesar 100 volt selama 90 menit. Gel direndam dalam larutan *staining* selama 24 jam dan direndam dalam larutan *destaining* selama 3x45 menit.

2.3. Analisis Data

Konsentrasi protein sekret kelenjar parotoid kodok juga dibandingkan dengan konsentrasi protein sekret kelenjar kulit katak Kongkang Racun (*Odorrana hosii*). Selanjutnya dilakukan analisis statistik nilai konsentrasi protein kodok dan katak melalui analisis *One Way ANOVA* untuk melihat signifikansi perbedaan konsentrasi protein tiap sampel.

Analisis pola protein dilakukan dengan membandingkan berat molekul pita protein sampel secara kualitatif dan kuantitatif. Secara kualitatif, berat molekul pita protein sampel diperkirakan

dengan membandingkan posisi pita protein sampel dengan posisi pita protein marker. Secara kuantitatif, berat molekul protein sampel diperoleh dari konversi nilai RF (*Retention Factor*) ke Log berat molekul (BM) melalui persamaan regresi pada kurva standar dari protein marker. Selanjutnya, nilai Log BM sampel dikonversi ke Anti Log untuk memperoleh nilai BM pita protein dalam satuan kilo Dalton (kDa) (Nurliyani *et al.*, 2005 dalam Taryono, 2009). Berat molekul protein sekret kelenjar parotoid kodok antar spesies dan dibandingkan pula BM pita protein sekret kelenjar parotoid kodok dengan sekret kelenjar kulit katak Kongkang Racun.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

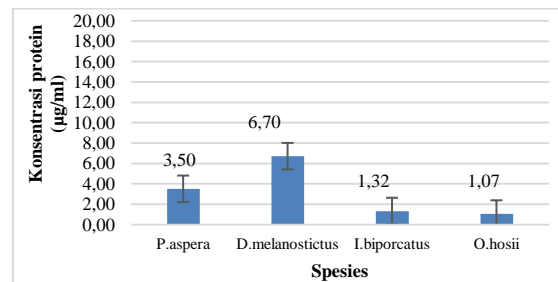
3.1. Ekstraksi Protein

Pada sekret kelenjar parotoid kodok, dari 100 µl sekret yang diekstraksi dengan 30% amonium sulfat diperoleh sekitar 30-50 µl ekstrak protein. Pada sekret kelenjar kulit katak, dari 1ml larutan sekret dalam buffer diperoleh hanya sekitar 10-20 µl ekstrak protein.

3.2. Pengukuran Konsentrasi Protein

Hasil pengukuran konsentrasi protein disajikan berupa histogram konsentrasi protein sekret kelenjar parotoid kodok (*Phrynoidis aspera*, *Duttaphrynus melanostictus* dan *Ingerophrynus biporcatus*) dan sekret kelenjar kulit katak (*Odorrana hosii*) (Gambar 1). Hasil tersebut menunjukkan konsentrasi protein sekret yang berbeda dalam volume sekret yang sama. Berdasarkan analisis statistik dengan *One Way ANOVA*, konsentrasi protein keempat spesies tersebut berbeda nyata.

Perbedaan konsentrasi protein sekret tidak terkait dengan ukuran tubuh kodok maupun katak. Perbedaan konsentrasi protein ini kemungkinan disesuaikan dengan kebutuhan akan sekret untuk mendukung kehidupannya, misalnya dalam menghadapi predator yang lebih banyak kemungkinan memerlukan sekret yang lebih banyak kandungan proteinnya. Disamping itu, masih ada kemungkinan lain, yakni adanya kandungan senyawa non protein seperti steroid dan alkaloid yang mendominasi sekret tersebut selain kandungan protein tersebut.



Gambar 1. Konsentrasi protein sekret kelenjar parotoid kodok (*Phrynoidis aspera*), *Duttaphrynus melanostictus* dan *Ingerophrynus biporcatus* serta sekret kelenjar kulit katak (*Odorrana hosii*).

Ketiga spesies kodok yaitu *Phrynoidis aspera*, *Duttaphrynus melanostictus* dan *Ingerophrynus biporcatus* menghasilkan sekret dari kelenjar parotoidnya dengan nilai konsentrasi protein yang beragam. Hal ini kemungkinan disebabkan adanya pengaruh beberapa faktor baik faktor internal (dalam tubuh) dan faktor eksternal (lingkungan). Berdasarkan faktor internal yakni adanya perbedaan sekuens DNA dari ketiga spesies tersebut (Frost *et al.*, 2006). Perbedaan urutan DNA ini dapat mempengaruhi jumlah protein yang dihasilkan dari ekspresi gen.

Katak kongkang racun (*Odorrana hosii*) berada dalam Familia Ranidae dan tidak memiliki kelenjar parotoid. Katak kongkang racun (*Odorrana hosii*) tentu memiliki DNA atau komposisi genom yang berbeda diantara ketiga spesies kodok tersebut, sehingga hal ini memungkinkan adanya perbedaan jenis dan konsentrasi protein dalam sekret.

Perbedaan konsentrasi protein ini juga dapat dipengaruhi oleh faktor eksternal berupa kondisi habitat dan jenis predator di habitat tersebut yang menentukan jumlah kebutuhan protein dalam sekret. Kodok dan katak hidup dengan kondisi habitat yang berbeda. Kodok *Phrynoidis aspera* dan katak *Odorrana hosii* ditemukan di habitat yang masih alami dengan kondisi lingkungan yang belum tercemar, sehingga lebih jarang menghadapi bakteri patogen. Hal tersebut kemungkinan menjadi penyebab lebih rendahnya kandungan protein dalam sekret kelenjar kulit katak khususnya yang terkait dengan fungsi pertahanan diri.

Kodok *Duttaphrynus melanostictus* biasanya ditemukan di tempat-tempat yang dekat dengan aktifitas manusia (Kurniati, 2003). Kodok ini dapat hidup diberbagai habitat bahkan di habitat dengan kondisi lingkungan yang buruk sehingga rawan terinfeksi mikroba patogen. Hal ini memungkinkan kebutuhan protein sekret yang berperan dalam sistem pertahanan dari infeksi mikroba lebih banyak, sehingga konsentrasi protein dalam sekret

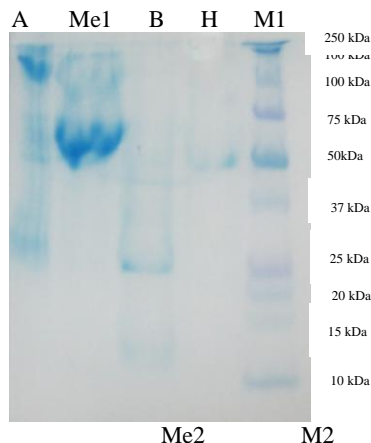
kelenjar parotoidnya lebih tinggi dibandingkan kedua spesies kodok lainnya.

Kodok *Ingerophrynus biporcatus* dapat ditemukan di hutan primer maupun sekunder, ataupun di tempat yang dekat dengan aktifitas manusia yang tidak terlalu ramai. Kondisi lingkungan di habitat kodok ini tidak terlalu tercemar namun tidak pula di habitat yang masih sangat alami, sehingga kemungkinan untuk terinfeksi mikrobial patogen tetap ada.

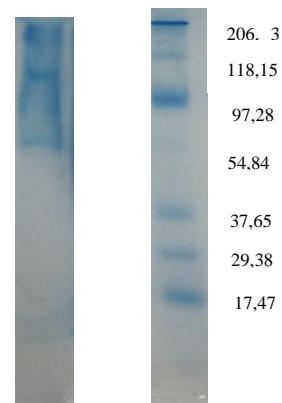
Kelenjar parotoid kodok dan kelenjar kulit katak Kongkang Racun mengandung berbagai macam senyawa salah satunya protein. Namun belum ada penelitian pasti terkait ada atau tidaknya peranan protein dalam mekanisme pertahanan diri kodok dari predator khususnya pada predator kelompok vertebrata. Meskipun demikian, menurut Conlon *et al.*, (2008) peptida bioaktif pada sekret kelenjar kulit katak terbukti berperan dalam mekanisme pertahanan diri dari predator berupa infeksi mikrobial patogen.

3.3. Pola Protein Sekret Kelenjar Parotoid Kodok dan Sekret Kelenjar Kulit Katak Kongkang Racun

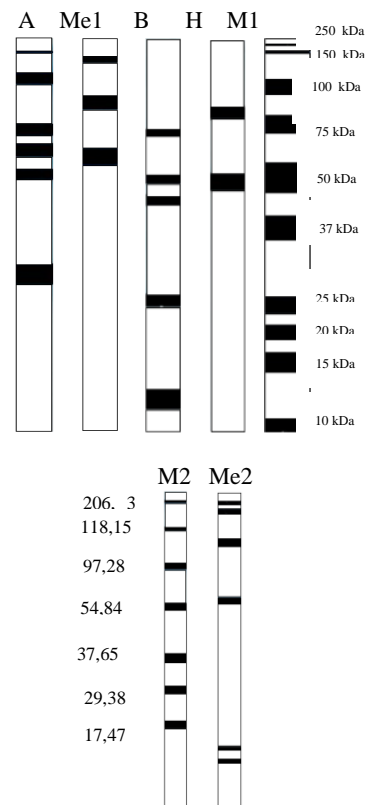
Pemisahan protein berdasarkan berat molekul akan memberikan gambaran pola pita protein pada media gel poliakrilamid. Pengamatan pola protein ini bertujuan untuk menentukan berat molekul protein yang terpisah dan membandingkan pola pita protein pada sekret kelenjar parotoid kodok dan kelenjar kulit katak.



Gambar 2. Pola pita protein sekret kelenjar parotoid kodok dan sekret kelenjar kulit katak Kongkang Racun berdasarkan hasil SDS-PAGE. M1: Marker protein 1 dengan berat molekul 10-250 kDa, A: sekret kelenjar parotoid kodok *Phrynomantis aspera*, Me1: sekret kelenjar parotoid kodok *Duttaphrynus melanostictus* namun fragmen protein tidak terpisah sempurna, B: sekret kelenjar parotoid kodok *Ingerophrynus biporcatus*, H: sekret kelenjar kulit katak Kongkang Racun (*Odorrana hosii*).



Gambar 3. Pola pita protein sekret kelenjar parotoid kodok dan sekret kelenjar kulit katak Kongkang Racun berdasarkan hasil SDS-PAGE. M2: Marker protein 2 dengan berat molekul 6,7-206,3 kDa, Me2: sekret kelenjar parotoid kodok *Duttaphrynus melanostictus* dengan fragmen protein yang telah terpisah.



Gambar 4. Pola pita protein sekret kelenjar parotoid kodok dan sekret kelenjar kulit katak Kongkang secara skematis. M1: Marker protein 1 dengan berat molekul 10-250 kDa, M2: Marker protein 2 dengan berat molekul 6,7-206,3 kDa, A: sekret kelenjar parotoid kodok *Phrynomantis aspera*, Me1: sekret kelenjar parotoid kodok *Duttaphrynus melanostictus* dengan fragmen belum terpisah sempurna, Me2: sekret kelenjar parotoid kodok *Duttaphrynus melanostictus* dengan fragmen telah terpisah, B: sekret kelenjar parotoid kodok *Ingerophrynus biporcatus*, H: sekret kelenjar kulit katak Kongkang Racun (*Odorrana hosii*)

Tabel 1. Berat Molekul (kDa) protein sekret kelenjar paratoid tiga spesies kodok dan sekret kelenjar kulit katak Kongkang Racun (*Odorrana hosii*).

Berat Molekul Protein (dalam kDa)				
<i>P.aspera</i>	<i>D.melanotictus</i> (1)	<i>D.melanostictus</i> (2)	<i>I.biporcatus</i>	<i>O.hosii</i>
172,51	173,65	145,33	74,17	78,73
109,63	124,84	124,15	69,23	66,17
73,15	61,8	113,25	44,82	
67,75		105,37	33,2	
64,52		55,39	12,09	
35,42			13,25	
			12,74	

Berdasarkan Gambar 2, 3 dan 4, menunjukkan 6 pita protein sekret kelenjar parotoid kodok *Phrynoidis aspera*, 5 pita protein sekret kelenjar parotoid kodok *Ingerophrynus biporcatus*, namun pada kodok *Duttaphrynus melanostictus* menunjukkan 7 pita protein dengan berat molekul protein yang beragam. Pada sekret kelenjar kulit katak *Odorrana hosii*, ditemukan 2 pita protein dengan berat molekul yang berbeda. Namun, hasil pemisahan protein tersebut sebagian masih nampak adanya *smear* yang menyebabkan pita protein tidak terbentuk secara mendatar (bergelombang). Hal ini kemungkinan masih adanya komponen lain non protein (lipid maupun polisakarida) sekret yang belum terpisahkan secara baik. Untuk mendapatkan hasil yang lebih baik sebaiknya dilakukan kembali proses purifikasi protein.

Kodok *Phrynoidis aspera*, *Ingerophrynus biporcatus* dan *Duttaphrynus melanostictus* merupakan kodok yang merupakan anggota Familia Bufonidae. Berdasarkan klasifikasi terdahulu, ketiga spesies kodok tersebut tergabung dalam genus yang sama yaitu genus *Bufo*. Namun kini ketiga spesies kodok tersebut berada dalam genus yang berbeda karena adanya perbedaan sekuens DNA. Perbedaan DNA ini juga dapat mempengaruhi jumlah dan jenis protein yang tersintesis pada sekret kelenjar parotoidnya. Perbedaan jenis protein yang ditunjukkan dari bervariasinya pola pita protein dapat disebabkan adanya perbedaan ekspresi dari gen tertentu dalam DNA, sebab tidak semua urutan DNA berupa gen dan tidak semua gen akan diekspresikan.

Perbedaan jenis protein ini dapat ditunjukkan dari bervariasinya berat molekul pita protein yang terbentuk dari tiap spesiesnya dengan rentang yang cukup luas (*board range*). Perbedaan protein ini dapat memberikan tambahan data bahwa protein juga dapat digunakan sebagai tambahan data analisis

klasifikasi molekuler ketiga spesies kodok tersebut. Namun ntuk membuktikan argumen tersebut masih diperlukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan sampel spesies kodok yang lebih banyak dengan habitat yang berbeda. Data perbedaan pola protein ini juga dapat mendukung hasil penelitian sebelumnya bahwa ketiga spesies kodok tersebut berbeda secara genetik. Data ini juga membuktikan adanya pola pita protein yang khas tiap genus maupun spesies dalam satu Familia.

Katak Kongkang Racun (*Odorrana hosii*) berada dalam Familia yang berbeda dengan Familia ketiga spesies kodok tersebut. Katak *Odorrana hosii* merupakan spesies anggota Familia Ranidae. Sekret yang dihasilkan pada katak ini berasal dari kelenjar kulit dan hanya berupa mukus. Dengan demikian, secara genetik katak dan kodok dalam penelitian ini berbeda sehingga protein yang terekspresi juga berbeda.

Meskipun demikian, sekret yang dihasilkan oleh kelenjar kulit katak *O.hosii* kemungkinan memiliki peran yang sama dengan sekret yang dihasilkan oleh kelenjar parotoid kodok, salah satunya yakni menghambat pertumbuhan bakteri dan fungi. Perbedaan protein ini menimbulkan asumsi bahwa protein sekret kelenjar parotoid kodok dan sekret kelenjar kulit katak mengandung peptida bioaktif dengan kemampuan daya hambat pertumbuhan bakteri dan fungi yang berbeda. Protein pada sekret kelenjar parotoid kodok terbukti berpotensi sebagai antibakteri (Gomes *et al.*, 2007), begitu pula dengan protein sekret kelenjar kulit katak *Odorrana hosii* (Conlon *et al.*, 2008). Dengan demikian, perlu dilakukan kajian bioaktivitas dan kemampuan protein pada sekret untuk hambat pertumbuhan bakteri dan fungi untuk mengoptimalkan potensi protein pada sekret sebagai antibakteri. Disamping itu perlu dilakukan pula uji farmakologis sekret terhadap patogen lainnya seperti cacing dan protozoa parasit.

Kondisi habitat dan jenis predator juga dapat mempengaruhi pola protein sekret kelenjar parotoid kodok dan kelenjar kulit katak. Kondisi habitat yang berbeda mempengaruhi keragaman predatornya dan jenis bakteri yang menginfeksi, sehingga protein yang terkandung dalam sekret menyesuaikan dengan kebutuhan kodok dan katak untuk melumpuhkan predatornya. Perbedaan kebutuhan jenis protein ini dibuktikan dengan pola protein sekret yang berbeda. Pola protein yang berbeda mengindikasikan adanya perbedaan potensi protein sekret sebagai antibakteri. Dengan demikian perlu dilakukan uji pengambatan pertumbuhan bakteri patogen pada tiap jenis protein yang terkandung dalam sekret kelenjar parotoid kodok dan katak *Odorrana hosii*.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan pola protein yang terkandung dalam sekret kelenjar parotoid kodok *Phrynoidis aspera*, *Duttaphrynus melanostictus* dan *Ingerophrynus bitorquatus*. Disamping itu terdapat perbedaan pola protein sekret kelenjar kulit katak *Odorrana hosii* dengan pola protein sekret kelenjar parotoid ketiga spesies kodok tersebut.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Melalui kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada Bapak Sugiono Hercules, S.E., atas donasi yang diberikan demi terlaksananya penelitian ini, segenap mahasiswa Pascasarjana Fakultas Biologi UGM dan Bapak Donan Satria Yudha, S.Si., M.Sc atas saran dan masukannya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan tulisan ini dengan baik. Demikian juga kepada semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu, penulis ucapkan terima kasih.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Conlon, J.M., Jolanta K., Norbert N., Jerome L., Hubert V., Laurent C., Thierry J. & Jay, D. K. (2008). Characterization of antimicrobial peptides from the skin secretions of the Malaysian frogs, *Odorrana hosii* and *Hylarana picturata* (Anura; Ranidae). *Elsevier*, 52:465.
- Frost, D.R., Taran, G., Julian, F., Raoul, H. B., Alexander H., Celio F. B. H., Rafael O., Alan C., Mark, W., Stephen, C., Christopher, J. R., Jonathan, A. C., Boris, L. B., Paul, M., Robert, C. D., Ronald, A. N., John, D. L., David, M. G. & Ward, C. W. (2006). The Amphibian Tree of Life. *Bulletin of The American Museum of Natural History*, 297(1):215, 218-219, 350-353, 36-365.
- Gomes, A., Biplab, G., Archita, S., Mishra, R., Subir, C. D., Debnath, A., & Apama, G. (2007). Bioactive molecule from amphibian skin: Their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible group development. *Indian Jurnal of Experiment Biology*, 45(1), 579-593.
- Kurniati, H. (2003). *Amphibians and Reptiles of Gunung Halimun National Park West Java, Indonesia*. Bogor, Indonesia: Research Centre of Biology-LIPI.
- Malik, N. (2012). *Antibacterial activity of skin secretion of Amietophrynus regularis (Amphibian) on three bacterial isolate strains : Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Klebsiella pneumonia*. Unpublished PhD thesis, Faculty of Science, University of Khartoum, Sudan.
- Qurniawan, T. F. & Deera, A. (2013). *Mikroanatomi Kelenjar Kulit Duttaphrynus melanostictus (Schneider, 1799) dan Kalaoula baleata (Müller, 1836) (Amphibia, Anura)*. *Buletin Anatomi dan Fisiologi*, 21(2), 2-6.
- Sciani, J.M., Claudia, B.A., Marta, M. A., Carlos, J. & Daniel, C. P. (2013). Differences and Similarities among Parotoid Marogland Secretions in South American Toads: A Preliminary Biochemical Delineation. *The Scientific World Journal*, 1(1), 1-2.
- Taryono. 2009. *Struktur Mikroanatomi Kelenjar Bisa dan Pola Protein Bisa Ular Buhu (Homalopsis bucaata L.) dan Ular Kobra (Najanaja sputatrix L.)*. Unpublished thesis. Program Studi Biologi Program Pasca Sarjana. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

